肠道对共生微生物的免疫耐受机制

乐佳清　王佳堃*

（浙江大学奶业科学研究所，杭州　310058）

摘　要：动物体肠道中存在数以亿计的微生物，这些共生的微生物能辅助动物体消化代谢和维持肠道稳态。但微生物及其代谢产物同样可以作为抗原影响肠道的正常功能。正常情况下，肠道免疫系统能准确辨识共生微生物及其代谢产物，对其做出免疫耐受，维持内环境稳态；此外，肠道免疫系统还可以避免由于对无害抗原产生反应而造成免疫资源的浪费。免疫耐受已被广泛应用于临床医学，用于减少器官移植后排斥现象的发生，降低子宫对胎儿的免疫排斥反应等。但就如何利用免疫耐受机制减缓反刍动物瘤胃酸中毒，提高瘤胃微生物蛋白质的合成和利用效率，完善益生素的饲用规程仍鲜有报道。为此，本综述就免疫耐受的一般概念和应用、肠道免疫系统的组成和功能、肠道共生微生物的免疫原性以及肠道免疫耐受的形成机制进行了阐述。

关键词：肠道共生微生物；肠道免疫系统；肠道免疫耐受；作用机制

中图分类号：S811.2　　　　　　　文献标识码：　　　　　　　　文章编号：

微生物是动物消化道内不可或缺的组成部分。经过长期的进化，动物体与微生物形成了一定意义上的互利共生和相互制约。微生物能辅助动物机体消化代谢、抑制病原菌定植和维持消化道稳态。同时微生物自身如细菌 DNA 和其代谢产物内毒素等含有的大量免疫刺激物，可以影响消化道的正常功能，甚至这些免疫刺激物能够穿过消化道屏障，转移到不同部位，致其他器官感染发生病变[1]。消化道作为动物机体接触外界环境中抗原物质最广泛的部位，正常情况下，一方面需要对无害的抗原如食物、共生微生物等做出免疫耐受，即具有免疫活性的细胞接触抗原性物质时所表现的一种无应答状态，避免由于对无害抗原起反应而浪费免疫资源[2]；另一方面对病原体产生免疫排斥与清除。了解肠道如何准确识别不同种类的物质并产生 2 种不同的免疫反应，有助于改进益生素的应用策略；选择性地改善反刍动物瘤胃微生物蛋白质的组成，减少免疫消耗。为此，本文就免疫耐受的一般概念和应用、肠道免疫系统的组成和功能、肠道共生微生物的免疫原性以及肠道免疫耐受的形成机制进行阐述。

收稿日期：2016-11-04

基金项目：中央高校基本科研业务费专项资金资助（2015FZA6016）

作者简介：乐佳清（1992-），女，浙江嘉兴人，硕士研究生，从事反刍动物营养研究。E-mail：945841362@qq.com

*通信作者：王佳堃，教授，博士生导师，E-mail：　jiakunwang@zju.edu.cn

1 免疫耐受的一般概念和应用

免疫耐受是指具有抗原特异性应答功能的 T 细胞和 B 细胞，在受抗原刺激后，不能被激活，不能产生特异性的免疫效应细胞和抗体，从而不能执行特异性免疫应答的现象[3]。引起免疫耐受的抗原被称为耐受原。免疫耐受分为天然免疫耐受和获得性免疫耐受。自身组织的抗原可以引起天然免疫耐受，而病原微生物等非自身的抗原，在一定条件下可以成为耐受原引起获得性免疫耐受[4]。免疫耐受也可以通过人为模拟天然免疫的方式进行人工诱导[4]。由于免疫耐受具有记忆性，机体在对某一抗原已形成免疫耐受的情况下，再次接触同一抗原时，会对该抗原产生特异性的无应答反应，但对其他抗原仍然有免疫应答的能力[5]，免疫耐受被广泛应用于临床医学。在器官移植前，通过诱导受体对供体（抗原）产生免疫耐受以避免器官移植后产生排斥现象[6]。Scandling 等[6]在进行主要组织相容性抗原（humen leukocyte antigen，HLA）相符的肾移植时，对受试者进行供者骨髓的移植，其结果显示超过 1/2 的患者都不再需要服用临床常规的免疫抑制剂。Correale 等[7]通过对多发性硬化症（multiple sclerosis，MS）患者进行蠕虫感染后其 MS 的综合征症状出现缓解，而再进行抗蠕虫感染后 MS 复发。免疫耐受在防治自然流产和胎儿宫内生长受限等症状中也具有重要作用。Arck 等[8]的研究表明，妊娠早期，胎儿的绒毛外滋养细胞（extravillous trophoblast，EVT）会侵入蜕膜组织，和母体蜕膜免疫细胞（decidual immune cells，DIC）等直接接触，建立母体和胎儿的精细交互对话。这种交互对话可以促进建立母体和胎儿的免疫耐受微环境，使胎儿在子宫内正常生长发育。免疫耐受在动物的饲养中同样具有重要作用。王泳翔等[9]研究发现，奶牛妊娠期口服孕酮可以诱导外周血中调节性 T 细胞增加，进而降低子宫对胎儿的免疫排斥反应。幼龄动物补饲益生素等生物添加剂效果优于成年动物，其深层机制也离不开免疫耐受这一理论。

2 肠道免疫系统的组成和功能

肠道免疫系统是机体免疫系统的一部分，普遍存在于肠道黏膜并直接接触外部环境中的抗原。肠道免疫系统不仅在识别和清除病原体的过程中发挥着重要作用，也是对食物、共生微生物等有益物质形成免疫耐受的重要部位[10]。肠道免疫系统主要由肠道相关淋巴组织（gut-associated lymphoid tissue，GALT）构成。从形态和功能方面可以将 GALT 分为 2 个部位，首先是由黏膜淋巴结组成的 GALT，主要包括派氏集合淋巴小结（Peyer’s patches，PP 结）和肠系膜淋巴结（mesenteric lymph nodes，MLN），是免疫反应的诱导部位；其次是由广泛分布在黏膜上皮和固有层的白细胞组成的 GALT，主要包括固有层单核细胞和上皮内淋巴细胞（intraepithelial lymphocyte，IEL），是免疫反应的效应部位[11]。

PP 结位于小肠的黏膜下层，含有大量的 B 细胞、T 细胞、巨噬细胞（macrophages，Mø细胞）和树突状细胞（dendritic cell，DC 细胞）。PP 结和肠腔间由滤泡相关上皮单细胞（follicle-associated epithelium，FAE）相隔分开。FAE 和黏膜中的上皮细胞不同，它的消化酶含量较低，刷状缘不明显以及不含聚合物免疫球蛋白(immunoglobulin，Ig)A 的受体[11]。FAE 最显著的特点是含有微褶曲（microfold，M）细胞。M 细胞具有较高的跨细胞转运活性，因此一般认为它是肠道免疫系统的起始位点[11]。

MLN 是机体内最大的淋巴结，其发育和 PP 结等不同，不受大部分细胞因子的影响，如肿瘤坏死因子（tumor necrosis factor，TNF）和受体等。现有的研究认为 MLN 可能是一个外部环境和黏膜再循环通路之间的十字路口[11]。

固有层中渗透了很多的淋巴细胞和骨髓细胞。如 T 细胞、B 细胞、Mø细胞、中性粒细胞、其他粒细胞和肥大细胞。这些细胞在调控免疫反应中都具有重要作用。

IEL 主要是 $CD3^+$ T 细胞，其次还包括分泌型免疫球蛋白 A（SIgA）+ B 细胞和自然杀伤细胞（natural killer cell，NK 细胞）。这些细胞可通过穿孔素、颗粒酶和 Fas 受体等消灭入侵的病原体和体内变性的细胞。此外，这些细胞也可通过分泌白细胞介素（interleukin，IL）-22、TNF-2α、转化生长因子-β（transforming growth factor-β，TGF-β）等来调节其他淋巴细胞与上皮细胞，实现免疫功能[2]。固有层淋巴细胞（LPL）主要包括 $CD4^+$ T 细胞和 SIgA+ B 细胞。T 细胞主要调节免疫反应，能分泌 IL-10 和 TGF-β 等下调免疫反应，也可影响 B 细胞产生 SIgA[2]。B 细胞则是通过分泌 SIgA 发挥免疫功能。SIgA 可以和抗原发生特异性结合，阻止抗原入侵并破坏黏膜屏障。

3 肠道共生微生物的免疫原性

动物体肠道中存在数量众多的微生物，这群微生物寄居在肠道中，与动物体形成了一定意义上的互利共生和相互制约。这些共生微生物可以作为抗原刺激肠道中特定的免疫细胞，使其活化、增殖和分化，最终产生特异性抗体或者致敏淋巴细胞诱发免疫应答。这种可以诱导免疫应答的特性，被称为免疫原性[12]。共生微生物自身和代谢产物含有大量免疫原性物质。首先，共生微生物中含有较多的核酸，其大多无免疫原性，但当其与蛋白质结合形成核蛋白后则具有免疫原性。其次，共生微生物中数量庞大的细菌细胞壁含有的肽聚糖（peptidoglycan）、磷壁酸（teichoic-acid）和脂多糖（lipopolysaccharide，LPS）等组分，其中部分组分具有免疫原性。已有研究表明，革兰氏阴性菌的细胞壁组分 LPS 作为一种内毒素（endotoxicity）具有强的免疫原性，当其大量作用于机体的肠道等组织时会引起免疫反应，

从而引发炎症等疾病[13]。此外，共生微生物经过消化等代谢作用后产生的大分子蛋白质、多糖和小分子多肽等同样具有免疫原性。

然而，由于肠道微生物区系的建立过程与免疫系统的完善过程基本同步，动物体出生时都是无菌的，但在出生后的极短时间内微生物在肠道内定植，由于新生动物的免疫系统调节网络较为脆弱，所以微生物等抗原接触后，极易导致终生或长期的耐受性，即对微生物产生特异性的无应答反应[14]。正常情况下，由于肠道对共生微生物免疫耐受的作用，肠道中存在着的大量共生微生物不会引起过度的免疫反应。因此，研究和了解肠道对共生微生物的免疫耐受机制可以将其有效应用于医学防治疾病和动物营养等，具有重要的应用价值。

4 肠道对共生微生物免疫耐受的机制

肠道对共生微生物的免疫耐受机制也分为天然性免疫耐受机制和获得性免疫耐受机制。

肠道由于缺乏识别某些微生物抗原的受体或肠道细胞表面存在抑制性受体和结构均可使肠道对共生微生物产生天然性免疫耐受。目前研究已发现 PP 结中的 Mø细胞在肠道对共生微生物形成天然免疫耐受中具有重要作用。

肠道内成熟的 T 细胞和 B 细胞遇到共生微生物等抗原可以形成获得性免疫耐受。获得性免疫耐受有多种类型。首先，成熟 T 细胞或 B 细胞的活化需要 2 种或以上的信号进行启动，而当部分信号因子被抑制时，T 细胞或 B 细胞就不能被活化，从而处于无反应状态，形成获得性免疫耐受[15]。DC 细胞、Toll 样受体(Toll-like receptors，TLR)和过氧化物酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferator-activated receptor，PPAR)γ 均参与了这一类型免疫耐受的形成。其次，当共生微生物等无害抗原由于某些原因不与免疫细胞接触，处于被忽视状态，从而可以形成免疫耐受[3]。共生微生物自身特性和肠型碱性磷酸酶（intestinal alkaline phosphatase，ALPI）在这一免疫耐受形成中具有重要作用。再次，通过 T-B 细胞或 T-T 细胞之间的 FasL（CD178）和 Fas（CD95）的结合，可以启动活化诱导的细胞死亡（activation induced cell death，AICD）即细胞凋亡（cell apoptosis），使对共生微生物等无害抗原具有反应性的 T 细胞或 B 细胞被消除[5,16]。其中，*FasL* 和 *Fas* 的表达量受许多因素的控制，如干扰素和 IL 等。有研究认为 IL-2 和 IL-12 含量的减少会使 Fas 介导的抗原特异性 T 细胞细胞凋亡增强[17]。最后是免疫调节细胞的作用，如调节性 T 细胞（regulatory cells，Treg 细胞）分泌抑制性细胞因子形成免疫耐受[18]。

以下是对 Mø细胞、DC 细胞、TLR、PPAR-γ、共生微生物自身特性、ALPI 和 Treg 细胞参与肠道对共生微生物的免疫耐受机制作具体的阐述。

4.1　Mø细胞参与的免疫耐受机制

Mø细胞属于白细胞的一种，可以吞噬和消化细胞碎片、微生物、癌细胞和外来物质等，在肠道中广泛存在。目前的研究认为Mø细胞至少存在 2 种亚型，M1 型经典 Mø细胞和 M2 型非经典 Mø细胞。M1 型 Mø细胞被认为是通过分泌干扰素-γ（IFN-γ)和 LPS 等被活化，参与促炎反应的调节，在宿主防御致病菌和病毒感染中发挥重要作用。M1 型 Mø细胞可以促进核转录因子-κB（NF-κB）依赖性炎性趋化因子的转录，分泌诱导型一氧化氮合酶（iNOS）和促炎因子如 TNF、IL-6 等，并诱导 Th1 反应，清除病原体[19]。M2 型 Mø细胞则通过 IL-4、IL-13 和免疫复合物等被活化，根据被活化的方式不同从而又分为 M2a、M2b、M2c。它们参与抗炎反应的调节，也与组织重建、纤维化和肿瘤疾病等相关。活化的 M2 型 Mø细胞不能产生 TNF、IL-6 等促炎因子，却主要分泌抗炎因子 IL-10。同时，M2 型 Mø细胞诱导产生的信号会抑制 M1 型 Mø细胞产生趋化因子的过程。Mantovani 等[20]的研究表明了 IL-4 和 IL-10 可以抑制依赖 IFN-γ 的炎性趋化因子 CXCL10 和 CCL5 等的产生；同时，IL-10 可以抑制 IκB 激酶（IKK）的活性进而抑制 NF-κB 的活化。不同亚型的 Mø细胞对不同微生物的识别不同，因此，肠道共生微生物可能通过 M2 型 Mø细胞的识别进而形成免疫耐受。

其次，Mø细胞依靠其表面的多糖等受体进行识别从而发挥功能，而部分肠道共生微生物可能由于无相应多糖或多糖被细胞表面的糖蛋白覆盖等原因，使巨噬细胞无法识别，进而形成免疫耐受[21-22]。

此外，Smythies 等[23]的试验显示，人类肠道中的 Mø 细胞不表达某些受体，包括 LPS 的受体 CD14，IgA Fc 段（Fcα）的受体 CD89 和 IL-2 的受体 CD25 等。此外，肠道内的 Mø细胞也不产生促炎细胞因子，包括 IL-1、IL-6 等，但在应对一系列炎症刺激时保留吞噬和杀菌的功能。

4.2　DC 细胞参与的免疫耐受机制

DC 细胞既是一种抗原递呈细胞，也是肠道黏膜免疫的调节因子。它在 PP 结中广泛存在，主要有 3 种亚型。第 1 种表达 CD11b 分子，同时受到 CD40L 刺激或者被金黄色葡萄球菌杀死后会在体内分泌 IL-10；第 2 种表达 CD8αα 分子；第 3 种不表达 CD11b 分子，也不表达 CD8α 分子，被称为双阴性 DC 细胞[24]。DC 细胞可以调节 $CD4^+$辅助性 T 细胞的多样性。接触抗原后，$CD4^+$辅助性 T 细胞会分化成不同的类型，主要有 3 种类型，其中 Th1 细胞分泌 IFN-γ，Th2 细胞分泌 IL-4 和 IL-13，Th3 细胞分泌 TGF-β，Tr-1 细胞分泌 IL-10 以及 Treg 细胞[25]。Th3、Tr-1 和 Treg 细胞可以抑制免疫反应，可能在免疫耐受中起到重要作用。不同亚型的 DC 细胞直接导致了 $CD4^+$辅助性 T 细胞分化反应的差异性。$CD8\alpha^+$型 DC 细胞

分泌 IL-12，并诱导了 Th1 细胞的反应。CD11b$^+$型 DC 细胞则是分泌 IL-10 并诱导 CD4$^+$抗原特异性 T 细胞分泌大量的 IL-10 并分化成 Treg 细胞引起免疫耐受。

正常情况下，肠道中大部分 DC 细胞处于未成熟状态，未成熟的 DC 细胞表面只表达较低水平的主要组织相容性复合体（MHC）类分子，仍具有很强的抗原摄取和加工的能力[26]。但由于未成熟的 DC 细胞基本不表达 CD40、CD80 和 CD86 等可以激活 T 细胞的辅助分子而不能使 T 细胞活化，形成免疫耐受状态。Dumitriu 等[27]的研究显示，肿瘤细胞的刺激能诱发 DC 细胞分泌 TGF-β，并抑制成熟 DC 细胞表面 CD86 等的表达，使其转变成未成熟的 DC 细胞。这种未成熟的 DC 细胞可以诱导初始 CD4$^+$T 细胞分化为 Treg 细胞，从而促使机体对肿瘤细胞形成免疫耐受。

因此，肠道共生微生物一方面可能通过促进具有免疫耐受功能的未成熟 DC 细胞的活化间接影响 CD4$^+$辅助性 T 细胞的分化，进而抑制了参与免疫反应的 T 细胞或 B 细胞的活化，形成免疫耐受；另一方面肠道共生微生物可以刺激成熟 DC 细胞转变成未成熟 DC 细胞以形成免疫耐受。

4.3　TLR 参与的免疫耐受机制

肠道黏膜上皮层中的一些细胞如肠上皮细胞（intestinal epithelial cell，IEC）、DC 细胞和 Mø细胞等表面都广泛存在一种模式识别受体，即 Toll 样受体家族（TLRs）。肠道免疫系统依靠 TLRs 识别病原相关分子模式（pathogen-associated molecular pattern，PAMP）进行物质识别。不同的 TLR 可以识别不同 PAMP，由此进行信号转导。TLR1/TLR2 复合体识别三酰基脂肽，TLR2/TLR6 复合体识别二酰基脂肽，TLR3 识别双链 RNA，TLR4/MD-2 复合体识别 LPS，TLR5 识别鞭毛蛋白，TLR7 识别咪唑喹啉，TLR8 识别单链 RNA，TLR9 识别细菌的 CpG DNA[28]。TLR 识别 PAMP 后使 TLR 的胞内区与连接蛋白(myeloid differentiation factor 88，MyD88)的 C 端 TIR(Toll/IL-1R)域结合。之后 MyD88 和 IL-1 受体相关激酶(IL-1 receptor associated kinase，IRAK）的 N 端结合形成复合体，激发 IRAK 的自磷酸化。然后促使转接蛋白 TNF 受体相关因子-6（TRAF-6）寡聚化，接着激活丝裂原活化蛋白 3 激酶（mitogen activated protein 3 kinase，MAP3K）中的转化生长因子激酶 1(transforming growth factor beta-activated kinase 1，TAK1)，进而激活 IKKα 和 IKKβ 的活化，促使 IκB 蛋白磷酸化和被降解[29]。最终 NF-κB 游离释放，同时转位到核内，和其他转录因子一起诱发促炎因子 *IL*-1、*IL*-8 等的表达，调控免疫应答[28]。这是经典的 MyD88 依赖型 TLR 信号传导途径。也有研究发现了 MyD88 非依赖型的信号传导途径，主要通过包含 Toll/IL-1 的接头蛋白（TIRAP，也称 Mal）和含 TIR 结构域的接头蛋白诱导的 IFN-β（TRIF，也称 TICAM-1）分别与 TLR2

或 TLR4 以及 TLR3 结合，介导 NF-κB 信号途径。此外，MyD88 依赖型和非依赖型信号传导途径都可以诱发 CD80 和 CD86 的表达，激发获得性免疫应答。

然而最新的研究认为，TLR 介导的信号传导途径中的某些变化同样可以起到免疫耐受的作用。例如罗佳等[30]通过构建肠道益生菌和病原菌鞭毛蛋白的系统发育树，比对鞭毛蛋白的 TLR5 识别序列，发现 TLR 对共生微生物和病原微生物的识别位点不同。病原菌和益生菌不同的鞭毛蛋白识别区域可能是鞭毛细菌适应 TLR5 识别的结果，据此宿主能够对病原菌和益生菌进行区分。由此，TLR 可能无法识别部分共生微生物，从而无法激活 NF-κB 通路，间接抑制了参与免疫反应的 T 细胞和 B 细胞的活化，进而形成免疫耐受。

另有研究表明，肠上皮细胞表面的某些 TLR 激活后，会抑制 IκB 降解，进而抑制 NF-kB 通路，间接抑制参与免疫反应的 T 细胞和 B 细胞的活化形成免疫耐受；而基底侧的某些 TLR 激活则会促进 IκB 降解，从而激活 NF-κB 通路，进而促进免疫应答[1,31]。Jongdae 等[32]通过对 NF-κB 的活化和 cDNA 的基因芯片分析，表明位于肠上皮细胞顶部及基底侧的 TLR9 有不同的功能，对肠道的稳态的维持具有重要作用。与之相对应的，有研究认为 IEC 表面缺少部分 TLR，如 TLR4 等。Naik 等[33]通过比较 TLR2 和 TLR4 在人外周血单个核细胞和人肠上皮细胞中的表达情况，发现 *TLR*2 在人外周血单个核细胞中的 mRNA 表达水平较高，同时也在人肠上皮细胞中表达；而 *TLR*4 则只在人外周血单个核细胞中表达。他们认为 TLR4 的缺乏与肠上皮细胞对 LPS 的低反应性有关。同时认为尽管 TLR2 在肠上皮细胞中存在，但其仅在肠道中细菌细胞壁达到病理性高浓度时被激活。

4.4 PPAR-γ 参与的免疫耐受机制

过氧化酶体（peroxisome）在机体内可以起到去除分子氧和氢过氧化物的作用，并与糖脂、胆酸、胆固醇合成和脂肪酸氧化相关。脂肪酸样的化学物质可以刺激过氧化物酶体的增殖，被称为过氧化酶体增殖剂（peroxisome proliferation，PP）。激活过氧化酶体增殖剂的受体就是 PPARs，其在不同的物种中存在 3 种亚型，分别为 PPAR-α、PPAR-β/δ 和 PPAR-γ[34]。PPAR-α 调节过氧化物酶体增殖剂的基因转录和肝脏过氧化物酶增生；PPAR-β 在骨骼肌和棕色脂肪中调控脂肪酸的代谢[35]。目前对 PPAR-γ 的研究最为广泛，*PPAR*-γ 主要在脂肪组织、巨噬细胞和大肠等中表达。PPAR-γ 与其配体 15-脱氧-Δ12，14-前列腺素 J2（15d-PGJ2）的相互作用可以调控免疫反应。研究表明 PPAR-γ 和 15d-PGJ2 的结合可以抑制 LPS 诱导活性蛋白-1（active protein-1，AP-1）、NF-κB、信号传导及转录激活因子（signal transducer and activator of transcription 1，STAT1）等介导的转录通路。PPAR-γ 与 NF-κB 间通过蛋白质-蛋白质的作用，抑制了 NF-κB 与炎症因子基因启动区的同源顺式元件结合，抑制了 NF-κB 通

路，间接抑制了参与免疫反应的 T 细胞和 B 细胞的活化，进而形成免疫耐受[36]。Knethen 等[37]的研究发现，15d-PGJ2 与格列酮类能通过活化 PPAR-γ 从而抑制聚羟基脂肪酸酯（PHA）诱导的 T 细胞增殖及 *IL*-2 的基因表达，进而抑制活化的 T 细胞与 IL-2 启动子中同源顺式元件相结合。活化的 PPAR-γ 可通过一系列的信号转导抑制促炎因子 TNF-α、IL-1、IL-2 和 IL-6 的生成，具有抗炎症作用。Kelly 等[38]的研究指出，多形拟杆菌可以触发 PPAR-γ 与 NF-kB 转录复合体上的 REL-A 亚基相结合，形成一个复杂的从细胞核到细胞质的运输，从而抑制 NF-kB 激活的促炎因子的转录表达。赖长华等[39]的试验结果显示，LPS 刺激引起断奶仔猪 *IL*-1、*IL*-6 和 *TNF*-α mRNA 表达量增加，同时 *PPAR*-γ mRNA 的表达量也明显增加。这些最新的研究结果表明共生微生物能通过诱导活化 PPAR-γ 抑制 NF-kB 的活性并间接抑制参与免疫反应的 T 细胞和 B 细胞的活化，实现对共生微生物的免疫耐受。

4.5　共生微生物自身特性参与的免疫耐受机制

共生微生物与致病菌存在很大差异，首先大部分共生微生物不能表达黏附因子和侵入因子，因此不能侵入肠道黏液层，同时小肠蠕动时可以将共生微生物冲离肠道表面，使其不能黏附在肠上皮表面，破坏上皮屏障，从而削弱了共生微生物定居到肠壁的能力[40]。其次肠道黏液层由黏蛋白组成，黏蛋白中的结合位点可以和肠上皮细胞上的结合位点形成竞争，阻止微生物黏附到肠上皮，促使在黏液层中的微生物在肠蠕动时被清除[25]。致病菌可以分泌黏蛋白酶分解黏蛋白以破坏肠道黏液层，而部分共生微生物不仅不分解黏蛋白还可以促进黏蛋白的分泌，增强肠上皮紧密连接的功能并且抑制某些致病菌的黏附。最后，研究已经发现内毒素是革兰氏阴性菌细胞壁的主要组成成分，其本质是 LPS。LPS 由 o-特异性链、外核心、内核心和类脂 A 构成，类脂 A 是 LPS 的生物活性组分[41]。Golenbock 等[41]的研究认为，部分共生微生物具有五聚化类脂 A（pentacylated lipid A），而致病菌则是六聚化类脂 A（hexacylated lipid A），这可能是共生微生物只表现低的内毒素毒性的原因，因此共生微生物不会引起剧烈的炎症反应。这些共生微生物的特性可以避免共生微生物与免疫细胞接触，从而引起免疫耐受。

4.6　ALPI 参与的免疫耐受机制

碱性磷酸酶（alkaline phosphatase，ALP）是广泛分布于机体肝脏、肠和胎盘等组织中经由肝脏向胆外排出的一种酶。这种酶能通过催化作用去除核酸分子 5'端的磷酸基团，使 DNA 或 RNA 片段的 5'-P 端转换成 5'-OH[42]。它不是单一的酶，而是一组同工酶。ALP 在牛、羊和小鼠等多种动物体内同样存在。ALPI 是来自肠绒毛上皮与成纤维细胞的一种 ALP。ALPI 可以作用于革兰氏阴性细菌细胞壁中 LPS，去除 LPS 的磷酸基团，从而达到抑制 LPS

引起的炎症反应的作用。Sayeda 等[43]通过对有无添加牛小肠 ALP 的小鼠分别进行鼠伤寒沙门氏菌和艰难梭菌的感染，发现添加了牛小肠 ALP 的小鼠与不添加牛小肠 ALP 的小鼠相比，其鼠伤寒沙门氏菌和艰难梭菌的定植明显减少，抑制了炎症反应。ALPI 可以降解共生微生物的抗原如 LPS，避免这类抗原与免疫细胞接触，从而引起免疫耐受。

4.7 Treg 细胞参与的免疫耐受机制

Treg 细胞即抑制性 T 细胞，由于其表达高水平的叉状头转录因子（FOXP3），它又被称为 $CD4^{+}CD25^{+}$、$CD4^{+}$CD25high 或者 $CD4^{+}$CD25highFOXP3^{+} T 细胞等。对比其他辅助性 T 细胞，在肠道免疫系统中 Treg 细胞分化优势明显，在免疫耐受中起重要作用。它主要调控抗原提呈细胞的功能，其中参与调节的有细胞毒 T 淋巴细胞相关抗原 4（CTLA-4）、CD39 和淋巴细胞活化基因 3（LAG-3）[4]。干扰 Treg 细胞会引发由 Th1、Th2 和 Th17 介导的类风湿性关节炎、过敏性炎症、炎症性肠病和 I 型糖尿病的产生。Qureshi 等[44]的研究表明，CTLA-4 含有 2 个配体（CD80 和 CD86）以及反应受体 CD28。Treg 细胞通过和 DC 细胞表面的 CD80、CD86 结合，使 CTLA-4 经胞吞作用从相对的细胞中捕获 2 个配体，转移后，这种共刺激的配体被表达 CTLA-4 的细胞降解移除，导致由 CD28 引起的 T 细胞活化通路受损，从而抑制 T 细胞的活化[44]。LAG-3 则是一种由调节性 T 细胞表达的 CD4 相关的跨膜蛋白，可以与主要组织相容性复合体Ⅱ（MHC Ⅱ）结合。MHC Ⅱ由于丙烯腈的竞争发生交联引发了由免疫受体酪氨酸激活基序（immunoreceptor tyrosine-based activation motif，ITAM）介导的抑制性信号通路，包括 IgG Fc 段受体（FcγRγ）和细胞外调节蛋白激酶（extracellular regulated protein kinases，ERK）介导的对蛋白酪氨酸磷酸酶-1（SHP-1）的补充，从而抑制了 DC 细胞的成熟和进行免疫刺激作用的能力，并进一步抑制了 T 细胞的活化[45]。此外，CD39，一种细胞表面相关的外核苷酸酶，可用于净化 Treg 细胞使其具有较强的抑制功能。$CD4^{+}CD39^{+}$T 细胞可以催化裂解三磷酸腺苷（ATP）转变为腺苷酸（AMP），然后进一步裂解腺苷[46]。Treg 细胞能够产生 IL-10、TGF-β 和 IL-35 等抑制性的细胞因子，他们可以抑制 T 细胞的功能从而导致免疫耐受的形成[3]。共生微生物可以促进 MLN 和 PP 结中 $CD4^{+}$Foxp3^{+}Treg 细胞的增殖和功能发挥，导致机体对共生微生物的免疫耐受。例如，Young 等[47]将 $CD4^{+}$VEGFR1high T 细胞转入 *RAG*2 基因敲除的小鼠，可以改善小鼠由于缺少淋巴细胞引起的炎症性肠病。Bae 等[48]的研究发现，黄芩黄素可以通过芳香烃受体诱导 Treg 细胞分化，上调 Treg 细胞相关因子的表达，增强肠道屏障功能从而改善食物过敏的症状，减少血清 IgE 和效应 T 细胞的作用。综上，共生微生物可能通过促进 Treg 细胞的活化和功能发挥形成免疫耐受。

5 小 结

虽然本文从 Mø 细胞、DC 细胞、TLR、PPAR-γ、共生微生物自身特性、ALPI 和 Treg 细胞参与的免疫耐受机制等多个方面综述了现有肠道对共生微生物的免疫耐受机制，但肠道免疫系统是一个复杂的网络结构，肠道共生微生物种类和定植过程复杂，现有研究多为孤立的、单一角度的验证。因此，系统生物学的发展，有望从整体出发，对免疫耐受给出更全面的解释，为深入阐释微生物与宿主互作提供支撑。同时，肠道对共生微生物的免疫耐受机制研究可以为反刍动物的科学饲养提供基础数据。当前，反刍动物营养大力提倡促进微生物蛋白的合成，由此可能引起肠道内微生物区系的改变，从而引发肠道免疫系统产生免疫反应并引发炎症。而肠道对共生微生物的免疫耐受机制研究可以为避免或抑制免疫反应的产生提供策略。此外，高精料添加引起的瘤胃酸中毒已成为反刍动物饲养的关键问题。高精料添加影响消化道微生物区系组成，而肠道对共生微生物的免疫耐受机制研究可以为选择性地改善反刍动物瘤胃微生物的组成提供策略，使得在不影响动物正常消化代谢的情况下缓解瘤胃酸中毒，并达到不引发炎症等疾病的目的。

参考文献：

[1]张羽萌,田菲,郭晓奎.肠道淋巴组织与共生细菌对肠道环境稳态的共同维持[J].中国微生态学杂志,2010,22(9):854–856.

[2] 徐凯进,李兰娟.肠道正常菌群与肠道免疫[J].国外医学·流行病学传染病学分册,2005,32(3):181–183.

[3] 朱小慧.免疫耐受机制的研究进展[J].细胞与分子免疫学杂志,2011,27(5):593–595.

[4] 李七渝,张绍祥.免疫耐受机制研究进展[J].免疫学杂志,2002,18(3):98–101.

[5] ANDERSON M S,SU M A.AIRE expands:new roles in immune tolerance and beyond[J].Nature Reviews Immunology,2016,16(4):247–258.

[6] SCANDLING J D,BUSQUE S,DEJBAKHSH-JONES S,et al.Tolerance and withdrawal of immunosuppressive drugs in patients given kidney and hematopoietic cell transplants[J].American Journal of Transplantation,2012,12(5):1133–1145.

[7] CORREALE J,FAREZ M F.The impact of parasite infections on the course of multiple sclerosis[J].Journal of Neuroimmunology,2011,233(1/2):6–11.

[8] ARCK P C,HECHER K.Fetomaternal immune cross-talk and its consequences for maternal and offspring's health[J].Nature Medicine,2013,19(5):548–556.

[9] 王泳翔,杨凌,毕江华,等.孕酮在反刍动物早期妊娠中的免疫耐受作用[J].中国畜牧兽医,2015,42(2):493–497.

[10] 左增妍,张彩.肠道黏膜免疫耐受机制研究进展[J].现代免疫学,2015,35(1):68–71.

[11] CASTRO-SÁNCHEZ P,MARTIN-VILLA J M.Gut immune system and oral tolerance[J].British Journal of Nutrition,2013,109(Suppl.2):S3-S11.

[12] LUO X,MILLER S D,SHEA L D.Immune tolerance for autoimmune disease and cell transplantation[J].Annual Review of Biomedical Engineering,2016,18:181–205.

[13] HAZIAK K,HERMAN A P,TOMASZEWSKA-ZAREMBA D.Effects of central injection of anti-LPS antibody and blockade of TLR4 on GnRH/LH secretion during immunological stress in anestrous ewes[J].Mediators of Inflammation,2014,2014:867170.

[14] CUKROWSKA B,KOZÁKOVÁ H,ŘEHÁKOVÁ Z,et al.Specific antibody and immunoglobulin responses after intestinal colonization of germ-free piglets with non-pathogenic *Escherichia coli* O86[J].Immunobiology,2001,204(4):425–433.

[15] ZHOU F,ZHANG G X,ROSTAMI A.Apoptotic cell-treated dendritic cells induce immune tolerance by specifically inhibiting development of $CD4^+$ effector memory T cells[J].Immunologic Research,2016,64(1):73–81.

[16] MALCHOW S,LEVENTHAL D S,LEE V,et al.Aire enforces immune tolerance by directing autoreactive T cells into the regulatory T cell lineage[J].Immunity,2016,44(5):1102–1113.

[17] 魏家臣.Fas/FasL 介导凋亡细胞机制及其病理生理意义[J].国外医学:外科学分册,2003(1):21–23.

[18] MIYARA M,SAKAGUCHI S.Natural regulatory T cells:mechanisms of suppression[J].Trends in Molecular Medicine,2007,13(3):108–116.

[19] 李丹,任亚娜,范华骅.巨噬细胞的分类及其调节性功能的差异[J].生命科学,2011,23(3):249–254.

[20] MANTOVANI A,SICA A,SOZZANI S,et al.The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization[J].Trends in Immunology,2004,25(12):677–686.

[21] 储成艳,吴云红,朱亮.巨噬细胞在移植排斥中的作用及其机制的研究进展[J].细胞与分子免疫学杂志,2015,31(12):1721–1723,1727.

[22] 秦惠玉.巨噬细胞与免疫耐受[J].上海免疫学杂志,1987,7(6):369–372.

[23] SMYTHIES L E,SELLERS M,CLEMENTS R H,et al.Human intestinal macrophages display

profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity[J].Journal of Clinical Investigation,2005,115(1):66–75.

[24] SATO A,IWASAKI A.Intestinal epithelial barrier and mucosal immunity——Peyer’s patch dendritic cells as regulators of mucosal adaptive immunity[J].Cellular and Molecular Life Sciences,2005,62(12):1333–1338.

[25] 束弋.肠道黏膜免疫系统的研究进展[J].微生物与感染,2007,2(1):59–62.

[26] 谷红红.树突状细胞与免疫耐受[J].国际输血及血液学杂志,2013,36(4):464–467.

[27] DUMITRIU I E,DUNBAR D R,HOWIE S E,et al.Human dendritic cells produce TGF-β1 under the influence of lung carcinoma cells and prime the differentiation of $CD4^{+}CD25^{+}Foxp3^{+}$ regulatory T cells[J].The Journal of Immunology,2009,182(5):2795–2807.

[28] 杨利娜,边高瑞,朱伟云.单胃动物肠道微生物菌群与肠道免疫功能的相互作用[J].微生物学报,2014,54(5):480–486.

[29] WANG S,CHARBONNIER L M,RIVAS M N,et al.MyD88 adaptor-dependent microbial sensing by regulatory T cells promotes mucosal tolerance and enforces commensalism[J].Immunity,2015,43(2):289–303.

[30] LUO J,LI W,DUAN Y F,et al.Host discriminates between probiotics and pathogens:impact of toll like receptor 5-flagellin interaction and evolution[J].Microbiology,2014,41(7):1368–1375.

[31] PETERSON L W,ARTIS D.Intestinal epithelial cells:regulators of barrier function and immune homeostasis[J].Nature Reviews Immunology,2014,14(3):141–153.

[32] LEE J,MO J H,KATAKURA K,et al.Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells[J].Nature Cell Biology,2006,8(12):1327–1336.

[33] NAIK S,KELLY E J,MEIJER L,et al.Absence of toll-like receptor 4 explains endotoxin hyporesponsiveness in human intestinal epithelium[J].Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition,2001,32(4):449–453.

[34] ISSEMANN I,GREEN S.Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators[J].Nature,1990,347(6294):645–650.

[35] 傅小雅,黄娴.过氧化物酶体增殖剂激活受体的研究进展和应用前景[J].中国热带医学,2008,8(2):321–325.

[36] NENCIONI A,WESSELBORG S,BROSSART P.Role of peroxisome proliferator-activated receptor γ and its ligands in the control of immune responses[J].Critical Reviews in Immunology,2003,23(1/2):1–13.

[37] VON KNETHEN A,BRÜNE B.PPARgamma-an important regulator of monocyte/macrophage function[J].Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis,2003,51(4):219–226.

[38] KELLY D,CAMPBELL J I,KING T P,et al.Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR-γ and RelA[J].Nature Immunology,2004,5(1):104–112.

[39] 徐世文,樱桃,李术.PPAR-γ 功能的研究进展[J].东北农业大学学报,2011,42(9):1–6.

[40] 王爱丽,武庆斌,孙庆林.肠道菌群与肠道黏膜免疫系统的相互作用机制[J].中国微生态学杂志,2009,21(4):382–385.

[41] GOLENBOCK D T,HAMPTON R Y,QURESHI N,et al.Lipid A-like molecules that antagonize the effects of endotoxins on human monocytes[J].The Journal of Biological Chemistry,1991,266(29):19490–19498.

[42] KIM E E,WYCKOFF H W.Reaction mechanism of alkaline phosphatase based on crystal structures:two-metal ion catalysis[J].Journal of Molecular Biology,1991,218(2):449–464.

[43] ALAM S N,YAMMINE H,MOAVEN O,et al.Intestinal alkaline phosphatase prevents antibiotic-induced susceptibility to enteric pathogens[J].Annals of Surgery,2014,259(4):715–722.

[44] QURESHI O S,ZHENG Y,NAKAMURA K,et al.Trans-endocytosis of CD80 and CD86:a molecular basis for the cell extrinsic function of CTLA-4[J].Science,2011,332(6029):600–603.

[45] LIANG B T,WORKMAN C,LEE J,et al.Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class Ⅱ [J].The Journal of Immunology,2008,180(9):5916–5926.

[46] MANDAPATHIL M,LANG S E,GORELIK E,et al.Isolation of functional human regulatory T cells (Treg) from the peripheral blood based on the CD39 expression[J].Journal of Immunological Methods,2009,346(1/2):55–63.

[47] SHIN J Y,YOON I H,LIM J H,et al.$CD4^+$VEGFR1high T cell as a novel Treg subset regulates

inflammatory bowel disease in lymphopenic mice[J].Cellular & Molecular Immunology,2015,12(5):592–603.

[48] BAE M J,SHIN H S,SEE H J,et al.Baicalein induces $CD4^{+}Foxp3^{+}$ T cells and enhances intestinal barrier function in a mouse model of food allergy[J].Scientific Reports,2016,6:32225.

Intestinal Immune Tolerance Mechanism of Symbiotic Microorganisms

LE Jiaqing　WANG Jiakun*

(*Institute of Dairy Science*, *Zhejiang University*, *Hangzhou* 310058, *China*)

Abstract: There are millions of microorganisms in the intestine of animals. These symbiotic microorganisms can assist digestion and metabolism of organisms and maintain intestinal stability. However, the microorganisms and their metabolites can also serve as an antigen affect the normal function of the intestine. Under normal circumstances, the intestinal immune system can accurately identify symbiotic microorganisms and their metabolites to make immune tolerance and maintain the stability of the internal environment. On the other hand, it avoids reaction to harmless antigens caused by the waste of immune resources. Immune tolerance has been widely used in clinical medicine to reduce the occurrence of rejection after organ transplantation and decrease uterine immune rejection of the fetus. However, there is little report on how to use the immune tolerance mechanism to reduce the rumen acidosis of ruminants and improve the synthesis and utilization efficiency of ruminal microbial protein, and to improve the feeding regulations of probiotics. Therefore, this review describes the general concepts and applications of immune tolerance, the composition and function of the intestinal immune system, the immunogenicity of intestinal symbiotic microorganisms and the mechanisms of intestinal immune tolerance.

Key words: intestinal symbiotic microorganisms; intestinal immune system; intestinal immune tolerance; mechanism

*Corresponding author, professor, E-mail: jiakunwang@zju.edu.cn　　（责任编辑　武海龙）